

嗜热乙醇杆菌中醛/醇脱氢酶的双启动子分析*

彭 惠¹ 毛忠贵¹ 武国干² 邵蔚蓝^{1,2,*}

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036) (南京师范大学微生物工程重点实验室 南京 210097)

摘要 克隆了嗜热乙醇杆菌(*Thermoanaerobacter ethanolicus*)中乙醇代谢的关键酶之一醛/醇脱氢酶(alcohol/acetaldehyde dehydrogenase, AdhE)基因的上游假定启动子序列,并进行了结构分析。结果表明,adhE的上游序列是启动子,能启动报告基因在大肠杆菌中持续表达。首次发现,adhE的启动子序列中存在两个独立的启动子(P₁₇₂和P₃₇)和核糖体结合位点(SD₁₇₂和SD₃₇),分别都具有完整功能,但其活性均低于完整的启动子序列。由此推测嗜热乙醇杆菌中adhE的表达受这两个启动子协同调控。

关键词 启动子,醛/醇脱氢酶,报告基因系统,嗜热乙醇杆菌

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0727-04

The Promoter Analysis of the *adhE* Gene Encoding the Aldehyde/alcohol Dehydrogenase in *Thermoanaerobacter ethanolicus**PENG Hui¹ MAO Zhong-Gui¹ WU Guo-Gan² SHAO Wei-Lan^{1,2,*}

(The key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(The Key Laboratory of Microbiol Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract The natural promoter of aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE) gene (*adhE*) from *Thermoanaerobacter ethanolicus* was analyzed in *Escherichia coli* using a gene expression reporter system. The sequence immediately upstream of *adhE* is recognized as a constitutive promoter in *E. coli*, as well as being presumably an active promoter in *T. ethanolicus*. The natural promoter of *adhE* is composed of two independent promoter regions, although activities of the two independent promoter regions are much lower than that of the natural promoter. The results indicate that the AdhE synthesis is cooperatively regulated by the two promoters in *T. ethanolicus*.

Key words Promoter, Aldehyde/alcohol dehydrogenase, Gene expression reporter system, *Thermoanaerobacter ethanolicus*

嗜热乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的乙醇产量可达 8%(V/V),在嗜热菌中是产量最高的。其乙醇代谢的最后两步反应是乙酰 CoA 转化为乙醛,乙醛生成乙醇。深入研究该途径,有助于将此菌改造成燃料乙醇生产菌株,为日益紧张的能源危机提供新的出路。

醛/醇脱氢酶(aldehyde/alcohol dehydrogenase, AdhE; EC 1.2.1.10, EC 1.1.1.2)是近年来新发现的脱氢酶家族。AdhE的最主要特征是由两个保守的结构域组成,醛脱氢酶结构域(aldehyde dehydrogenase, Aldh)和醇脱氢酶结构域(alcohol dehydrogenase, Adh)。AdhE可以连续催化乙酰 CoA

生成乙醛再转化为乙醇。国际上已经报道的 AdhE 共有 9 个,国内未见报道。在大肠杆菌、*Clostridium acetobutylicum*、*Giardia lamblia*、*Lactococcus lactis* 中 AdhE 都被证明是乙醇代谢的关键酶^[1,2,3,4]。据 Zeikus JG 等报道,嗜热乙醇杆菌 39E 中乙醇代谢的关键酶包括 I 型 Adh、II 型 Adh 和 Aldh,没有 AdhE 的报道^[5]。最近,公布了嗜热乙醇杆菌 39E 全基因组序列,通过保守性分析,发现一个命名为 Adh 的蛋白与 *C. acetobutylicum* 中 AdhE^[2]相似性为 52%。我们在嗜热乙醇杆菌 JW200 中克隆了该基因及其上下游序列(GenBank 登陆号 DQ836061),重组酶的酶学性质分析证明它是 AdhE。为了阐述 AdhE 如何

* 973 项目子课题基金(No. 2004CB719600),国家自然科学基金(No. 30170511)

** 通讯作者 Tel: 025-83598838, E-mail: wlshao@jssmail.com.cn

收稿日期:2006-12-06,修回日期:2007-03-15

参与乙醇代谢调控,必须对 *adhE* 基因的启动子展开深入的研究,本文报道了 *adhE* 基因上游启动子的结构分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:嗜热乙醇杆菌 JW200(ATCC 31550)和海栖热袍菌 *Thermotoga maritime* 由美国佐治亚大学微生物系 J. Wiegel 实验室惠赠;大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司;质粒 pUC19 购自 Novagen 公司。

1.1.2 酶和化学试剂:限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为宝生物公司产品;木聚糖和 PAHBAH 购自 Sigma;其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 基因操作:分子克隆技术参照文献[6]。

1.2.2 嗜热乙醇杆菌 JW200 中 *adhE* 启动子的克隆:根据 GenBank 上嗜热乙醇杆菌 39E 中疑似 *AdhE* 上下游蛋白序列设计一对引物, Ap (5'-ATATGCCTTTACCCGAAG-3') 和 At (5'-CCTCTAGAGACAACCTTCAGGAGTATC-3')(黑体为 *Xba*I 酶切位点)。使用菌株 JW200 的基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物酶切后与 *Sma*I/*Xba*I 酶切后的 pUC19 连接,产生质粒 pUCN-*adhE*。该质粒由上海生工测序。

1.2.3 大肠杆菌中报告基因系统的构建:选择来源于海栖热袍菌的木聚糖酶 B 基因(*xynB*)为启动子研究的报告基因。以海栖热袍菌基因组为模板,使用引物 Xn (5'-ATGTCTCAGAATGTATCTCTG-3')和 Xc (5'-CCCTCGAGTTATTTTCTTCTTCTATTTCCTT-3')(黑体是 *Xho*I 酶切位点)进行 PCR 扩增。同时,为了保留 *adhE* 基因完整的启动子和终止子,仅删除 *adhE* 基因,以 pUCN-*adhE* 为模板,使用引物 Apv (5'-AAGAACACCTCCATATTG-3')和 Atv (5'-CCCTCGAGGAAAAGCCTATGGAGAAT-3')(黑体是 *Xho*I 酶切位点)进行反向 PCR 扩增。这两个 PCR 产物酶切后连接,产生质粒 pUC-*xynB*-477。以下带有缺失了不同序列的启动子的质粒均以 pUC-*xynB*-477 为模板,运用反向 PCR 技术构建。为了仅删除假定的启动子 P₃₇,使用引物 A37-n-SD (5'-TTGTTAAATTATTATCAATATGG-3')和 A37-c (5'-

GTGTACTTCGAAAAATTTAAG-3'),PCR 产物自身环化后为质粒 pUC-*xynB*-172-SD。为了删除假定的启动子 P₃₇ 和 SD₃₇,使用引物 A37-n (5'-TTCCTATGTCTCAGAAT-3')和 A37-c,PCR 产物自身环化后为质粒 pUC-*xynB*-172。为了删除假定的启动子 P₁₇₂ 和 SD₁₇₂,使用引物 A172-n (5'-TGTAAATGAATAACAA-3')和 A172-c (5'-TAGTGATAAATCGATATG-3'),PCR 产物自身环化后为质粒 pUC-*xynB*-37。为了删除两个假定的启动子 (P₁₇₂ 和 P₃₇)和两个 SD 序列 (SD₁₇₂ 和 SD₃₇),反向 PCR 是以 pUC-*xynB*-37 为模板,使用引物 A37-n 和 A37-c,得到的质粒 pUC-*xynB* 作为空白对照。

1.2.4 分析软件:启动子使用 Neural Network Promoter Prediction(2.2 版)(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)分析。序列的同源性使用 DNAMAN(4.0 版)分析。

1.2.5 木聚糖酶酶活的测定:构建好的质粒转化大肠杆菌,过夜培养,离心收集细胞,重悬后超声破壁,离心,取上清分析酶活。标准反应体系为:100 μ L 0.5%木聚糖和 80 μ L 50 mmol/L pH 6.5(95 $^{\circ}$ C)的邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液,加入适量酶液,以去离子水补足终体积至 200 μ L。95 $^{\circ}$ C 反应 10min 后,加入 600 μ L 终止剂/显色剂(0.5 mol/L NaOH 和 5% PAHBAH 以 4:1 体积混合)终止反应。空白对照在反应终止后补加酶液。将终止的反应液置于沸水浴加热 10min,冰水冷却后,410nm 处测定吸收值。一个木聚糖酶活性单位(U)定义为每分钟催化产生 1 μ mol 木糖的酶量^[7]。

2 结果

2.1 嗜热乙醇杆菌 JW200 中 *adhE* 启动子的序列特点

嗜热乙醇杆菌 JW200 中 *adhE* 启动子序列全长 477bp,与菌株 39E 中 *adhE* 启动子序列的相似性为 70%。软件分析表明,该序列含有两个核糖体结合位点 SD₁₇₂ 和 SD₃₇,两个启动子区域 P₁₇₂(-35₁₇₂, -10₁₇₂)和 P₃₇(-35₃₇, -10₃₇)。两个 -10 启动子区域均发现存在反向重复序列。其中 -10₁₇₂ 的反向重复序列为 13bp;-10₃₇ 的反向重复序列为 14bp。见图 1。调控区的反向重复序列的生理意义是提高 mRNA 的稳定性或加强转录^[2]。



图 1 嗜热乙醇杆菌 JW200 中 *adhE* 启动子序列

起始密码子 ATG 用弯箭头标出; -35 和 -10 启动子区域用黑体表示 SD 序列用方框标出, 对称的箭头表示的是反向重复序列, 构建报告基因系统中各质粒的引物用下划线标出。

2.2 大肠杆菌中报告基因系统的构建

为了研究 *adhE* 启动子的结构特点, 在大肠杆菌质粒 pUC19 上建立了以 *xynB* 为报告基因的分析系统。各种完整或缺失的启动子片段融合在 *xynB* 的 5' 端, 这些启动子片段的强度区别可以通过 *xynB* 的差异表达反映出来。为了确保 *xynB* 的表达仅受待分析的各种启动子片段转录调控, *xynB* 表达元件框的转录方向与 pUC19 上 *lac* 启动子的方向相反。

5 个包含不同启动子片段的质粒的示意图见图 2。质粒 pUC-*xynB*-477 包含完整的 *adhE* 启动子序列; 质粒 pUC-*xynB*-172-SD 包含启动子 P₁₇₂ 和两个 SD 序列(SD₁₇₂ 和 SD₃₇); 质粒 pUC-*xynB*-172 包含启动子 P₁₇₂ 和 SD₁₇₂; 质粒 pUC-*xynB*-37 包含启动子 P₃₇ 和 SD₃₇; 质粒 pUC-*xynB* 是空白对照, 删除了这两个启动子和两个 SD 序列。

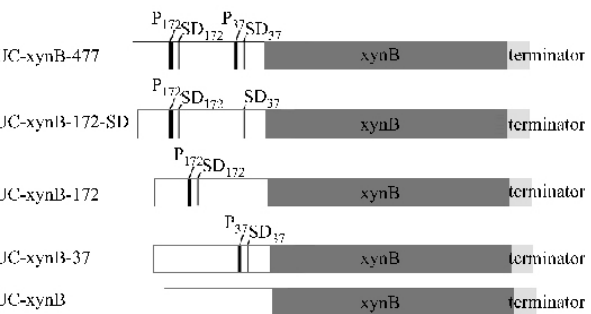


图 2 报告基因系统中不同启动子片段的质粒示意图

2.3 *adhE* 启动子分析

构建好的报告基因系统可以直接在大肠杆菌中表达, 不需要添加诱导物, 说明来源于嗜热乙醇杆菌 JW200 的 *adhE* 启动子被识别为组成型启动子。含有不同质粒的大肠杆菌培养后破壁, 粗酶液在 95℃ 测定木聚糖酶酶活。结果如图 3 所示。

完整的启动子(pUC-*xynB*-477)表达量最高, 为

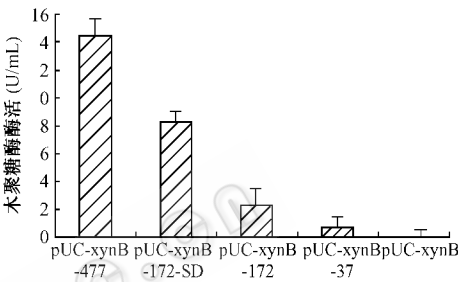


图 3 报告基因系统分析木聚糖酶酶活

14.5 U/mL。启动子 P₁₇₂ 和两个 SD 序列(pUC-*xynB*-172-SD)的表达水平为 8.3 U/mL, 是完整启动子的 60%。启动子 P₁₇₂ 和 SD₁₇₂ (pUC-*xynB*-172)的表达量与启动子 P₃₇ 和 SD₃₇ (pUC-*xynB*-37)的表达量急剧下降, 分别为 2.3 U/mL 和 0.7 U/mL, 是完整的启动子表达量的 16% 和 5%。两个启动子和两个 SD 序列删除后的空白对照(pUC-*xynB*)没有测到酶活, 表明 *adhE* 上游序列中除了分析出的两个启动子外, 不存在其它启动子。由以上数据可以得出结论: 1) *adhE* 上游序列确实是启动子区域, 和软件分析结果吻合; 2) *adhE* 的启动子序列包含两个启动子和相应的核糖体结合位点, 并且皆能单独行使其功能。它们强度各异, 表明调控因子可能是不一样的; 3) 两个启动子单独作用时的活性远低于共同作用时, 表明 *adhE* 的表达是这两个启动子协同调控的结果。

3 讨论

AdhE 的出现被认为是 Aldh 与 Adh 融合的产品, 是乙醇代谢进化的转折点。然而除了参与乙醇代谢, 在大肠杆菌中 AdhE 还可以促使丙酮酸甲酸裂解酶的失活, 并且天然状态下以螺旋状的原聚体形式存在, 其生理意义不清楚^[1]。AdhE 的多功能性折射出该基因表达调控的复杂性。目前已报道

的 5 个 *adhE* 的启动子中,有 3 个具有两个独立作用的启动子区域^[128]。其中大肠杆菌 *adhE* 的启动子研究最为深入。在大肠杆菌中,*adhE* 的启动子包括 -292 和 -188 两个启动子区域,转录因子 NarL 和 RpoS 对这两个位点都有调控作用,而转录因子 Fnr 仅对 -188 位点起作用,转录因子 Fis 仅对 -292 位点起作用。同时,在 -188 位点转录的 mRNA 的翻译需要 RNase III 的参与。因此,大肠杆菌中 AdhE 的表达受到转录和翻译两个水平的调控^[9,10]。在嗜热乙醇杆菌中,*adhE* 启动子也包括两个可以单独行使功能的启动子区域,并且 P_{172} 的活性要高于 P_{37} ,推测 *adhE* 的表达是受这两个启动子协同调控。两个启动子共同作用时的活性远远高于各自单独作用时,暗示这两个启动子的功能并不是简单叠加的关系,可能存在更复杂的机理。值得注意的是,启动子 P_{172} 和两个 SD 序列一起作用时,表现出的活性高于启动子 P_{172} 仅和 SD_{172} 一起作用时的活性,除了两个 SD 序列加强翻译外,不知道是否还存在其它原因。详细的调控机理在进一步研究中。

参考文献

- [1] Kessler D, Leibrecht I, Knappe J. FEBS Letter, 1991, **281**: 59 ~ 63.
- [2] Fontaine L, Salles I M, Girbal L, et al. Journal Bacteriology, 2002, **184**(2): 821 ~ 830.
- [3] Sánchez L B. Archives Biochemistry Biophysics, 1998, **354**(6): 57 ~ 64.
- [4] Arnau J, Jørgensen F, Madsen S M, et al. Journal Bacteriology, 1998, **180**(6): 3049 ~ 3055.
- [5] Burdette D, Zeikus J G. Biochemistry Journal, 1994, **302**: 163 ~ 170.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [7] Shao W, Deblois S, Wiegel J. Applied Environmental Microbiology, 1995, **61**(11): 937 ~ 940.
- [8] Nair R V, Bennett G N, Papoutaskis E T. Journal Bacteriology, 1994, **176**(5): 871 ~ 885.
- [9] Membrillo-Hernández J, Lin E C C. Journal Bacteriology, 1999, **181**(12): 7571 ~ 7579.
- [10] Aristarkhov A, Mikulskis A, Belasco J G, et al. Journal Bacteriology, 1996, **178**(8): 4327 ~ 4332.